

〔食物アレルギー定量検査キット〕

## アレルギーアイ ELISA®Ⅱ 牛乳（β-ラクトグロブリン）（商品コード：077836）

## 取扱説明書

本製品をご使用になる前に必ずお読みください。

## 【特徴】

1. 本製品はマイクロプレートを使用した ELISA 法による測定キットです。
2. 牛乳に多く含まれるタンパク質（β-ラクトグロブリン）に特異的に反応するモノクローナル抗体を用いており、食品中に含まれる牛乳タンパク質を高感度に測定可能です。
3. 原材料から加工食品まで幅広く適用可能です。
4. 抽出液はアレルギーアイ ELISAⅡすべての項目で共通のため、複数項目の検査にご使用いただけます。
5. このキットは、特許第 5451854 号を利用しています。

⚠ 注意：加工食品の場合には目的タンパク質の抽出効率の低下や、目的タンパク質の変性などの理由により検出感度が低下することがあります。

## 【製品構成】

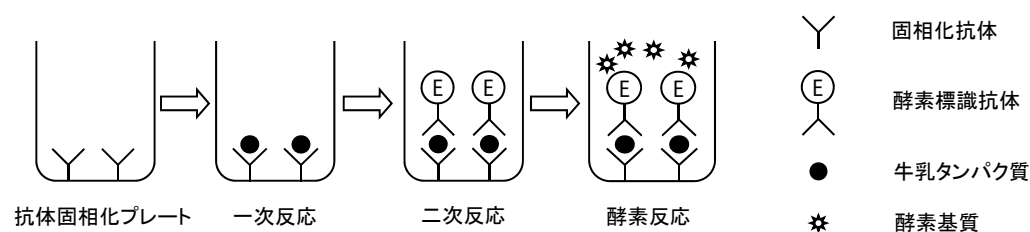
	品名	容量	数量
A	抗体固相化プレート(カバー付)	96ウェル(8ウェル×12列)	1枚
B	標準品(50 ng/mL)	1 mL	2本
C	酵素標識抗体液	13 mL	1本
D	発色液 (TMB 溶液)	13 mL	1本
E	反応停止液 (0.5 M 塩酸、0.25 M 硫酸)	13 mL	1本
F	希釈用緩衝液	100 mL	1本
G	洗浄液 (10 倍濃縮)	100 mL	1本
H	抽出用 A 液 (10 倍濃縮液)	100 mL	1本
I	抽出用 B 液 (10 倍濃縮液)	100 mL	1本
J	抽出用 C 液 (10 倍濃縮液)	100 mL	1本
—	取扱説明書		1部

## 【目的・性能】

1. 食品中に含まれる牛乳タンパク質（β-ラクトグロブリン）の測定
2. 溶液中の牛乳タンパク質を 0.78～50 ng/mL の範囲で測定可能

## 【測定原理】

1. 牛乳タンパク質と結合する抗体がプレートのウェル内に固相化されています。
2. 試料中の牛乳タンパク質がプレート上の抗体に捕捉され複合体を形成します。（一次反応）
3. 酵素標識抗体がプレート上の複合体に結合します。（二次反応）
4. 発色液を加えると複合体に結合した酵素により呈色します。（酵素反応）
5. 反応停止液で発色を停止し、測定を行います。
6. 得られた吸光度に対応する牛乳タンパク質濃度を標準曲線から算出します。



## 【必要な機器、器具】

1. マイクロピペット（50 μL～1000 μL の範囲が必要です）、メスシリンダー、ビーカー、50 mL 遠沈管
2. 粉砕機（フードカッター、ミルミキサーなど）
3. 振とう機
4. 遠心分離機
5. 天秤
6. プレートリーダー（単波長:450 nm または 2 波長:主波長 450 nm、副波長 600-650 nm）
7. 解析ソフト（4 係数 Logistic 解析が可能なもの）

## 【測定の際の注意事項】

1. 検体の調製場所と検査場所は区切られた空間で行ってください。
2. 試薬は室温（20-25℃）に戻し、指定の方法に従い調製してください。
3. 測定は 2 重測定以上で行ってください。（3 重測定を推奨します。）
4. 反応温度は室温（20-25℃）で行ってください。また、反応時間は厳守してください。
5. 分注量に注意し、分注器具は定期的に検定してください。
6. 器具を介した汚染を防ぐため使い捨てのチューブ、ピペットおよびフィルター付チップの使用と操作毎のチップの交換をお勧めします。抽出に用いる器具は検体毎に十分な洗浄を行ってください。
7. 本製品による測定は高感度なため必ずプレートカバーを用い、清潔な環境で行ってください。また、使い捨て手袋、マスクの使用をお勧めします。
8. 各反応後の洗浄が不十分な場合、バックグラウンドが高くなる可能性があります。ウェル内の液をペーパータオルを使用して叩くなどして確実に除き、洗浄後は速やかに次の試薬を分注してください。
9. 酵素反応は遮光下で行ってください。
10. プレートの底は触れないようにしてください。指紋等で曇った場合は十分に拭き取り測定してください。

## 【試薬の調製】

1. 検体抽出液：  
H:抽出用 A 液、I:抽出用 B 液、J:抽出用 C 液および精製水を 1：1：1：7 の割合で混合しよく攪拌した後、使用してください。  
※抽出用 A 液に沈殿が生じている場合は加温溶解してからご使用ください。溶解後は室温で保存可能です。  
抽出用 C 液はまれに白濁することがありますが、性能に問題はありません。

〈検体抽出液調製例：24 検体分調製する場合〉	
H：抽出用 A 液(10 倍濃縮液)	50 mL
I：抽出用 B 液(10 倍濃縮液)	50 mL
J：抽出用 C 液(10 倍濃縮液)	50 mL
精製水	350 mL
合計	500 mL

2. F:希釈用緩衝液：  
使用前に室温に戻してそのまま使用してください。  
※希釈用緩衝液は、アレルギーアイ ELISAⅡシリーズで「卵（オボアルブミン）」、「牛乳（β-ラクトグロブリン）」、「小麦」、「落花生」は共通で使用できます。「そば」はそばキット専用となりますので、そばキットの希釈用緩衝液はその他のキットに使用しないでください。
3. A:抗体固相化プレート：  
アルミパウチから出さず室温に戻し、その後必要な列数を取り出してください。開封後はすぐに使用してください。
4. 標準品希釈液： 調製した検体抽出液を F:希釈用緩衝液で 20 倍に希釈してください。
5. 標準溶液： B:標準品を標準品希釈液で下記の希釈例を参考に希釈してください。  

標準溶液濃度(ng/mL)	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0
標準品添加量(μL)	800	400	400	400	400	400	400	0
標準品希釈液添加量(μL)	0	400	400	400	400	400	400	400

 ※標準溶液の希釈は用事調製して下さい。また、測定毎に標準曲線を作成して下さい。
6. G:洗浄液： 精製水で 10 倍に希釈してください。
7. C:酵素標識抗体液： 使用前に室温に戻し、そのまま使用してください。

8. D:発色液： 使用前に室温に戻し、そのまま使用してください。
9. E:反応停止液： 使用前に室温に戻し、そのまま使用してください。

#### 【検体の調製法・抽出法】

1. 被検食品(検体)をミキサーなどで粉碎し均質化し調製試料とします。
2. 調製試料 1 g をポリプロピレン製 50 mL 遠沈管に取り、調製した検体抽出液 19 mL を加えてよく混合し固形分を均等に分散します。
3. 振とう機に遠沈管を横にして置き、室温で一晩振とうしながら抽出します(90~110 往復ストローク/分、室温、振とう幅 3 cm 程度)。振とうにより、液が遠沈管の両端に打ち付けるように調整します。時々遠沈管の上下を入れ替える等して、液面に沿って付着する検体を分散させます。pH を確認し中性付近(pH6.0-8.0)になるように調整します。  
\*このとき加えたアルカリ(あるいは酸)の容量を加味し、最終的な牛乳タンパク質含有量を算出してください。
4. 抽出試料を 3,000×g、室温で 20 分間遠心分離し、分離された上清を回収、もしくは沈査が得られない場合は上清をろ過し、ろ液を回収します。
5. 回収した上清もしくはろ液を F:希釈用緩衝液で 20 倍希釈したものを測定溶液とします。(例：希釈用緩衝液 950 μL に、上清またはろ液 50 μL を加えます。)  
\*さらに希釈して測定する場合は標準品希釈液を調製し希釈に用いてください。

#### 【抽出操作フローチャート】

- 検体抽出液調製
- 希釈用緩衝液を室温に戻す
- 被検食品
  - ↓  均一な状態に粉碎
- 調製試料 1 g
  - ↓  調製済み検体抽出液 19 mL 混和、振とう一晩(12 時間以上)、室温
  - ↓  pH6.0-8.0 に調整
- 抽出試料
  - ↓  3,000×g 室温 20 分 遠心分離
- 遠心上清
  - ↓  必要に応じてろ過
- 上清もしくはろ液
  - ↓  希釈用緩衝液で 20 倍希釈
- 測定溶液

#### 【測定法】

1. 一次反応
  - 1) A:抗体固相化プレートをアルミパウチを開封せずに室温に戻し、その後必要列数のみ取り出します。プレート背面の乾燥剤は取り外し残りのプレートと共にアルミパウチに入れ、パウチ内を乾燥状態に保ってください。
  - 2) 各ウェルに標準溶液(0、0.78~50 ng/mL)、測定溶液を 100 μL ずつ添加します。
  - 3) 軽く攪拌した後、プレートカバーをし、室温で正確に 1 時間静置して反応させます。
2. 二次反応
  - 1) ウェル内の溶液を完全に除去し、各ウェルあたり 300-400 μL ずつの洗浄液で 5 回洗浄します。
  - 2) 室温に戻した C:酵素標識抗体液を各ウェルに 100 μL ずつ分注します。
  - 3) 軽く攪拌した後、プレートカバーをし、室温で正確に 30 分間静置して反応させます。
3. 酵素反応
  - 1) ウェル内の溶液を完全に除去し、各ウェルあたり 300-400 μL ずつの洗浄液で 5 回洗浄します。
  - 2) 室温に戻した D:発色液を各ウェルに 100 μL ずつ分注します。
  - 3) 軽く攪拌した後、プレートカバーをし、室温遮光下で正確に 10 分間静置して反応させます。
  - 4) 室温に戻した E:反応停止液を各ウェルに 100 μL ずつ分注し、軽く攪拌し酵素反応を停止させます。
4. 測定
  - 1) プレートリーダーを用い主波長 450 nm、副波長 600-650 nm の条件で各ウェルの吸光度を測定します。  
\*酵素反応停止後は 30 分以内に吸光度を測定してください。
  - 2) 標準溶液の吸光度より標準曲線を作成し、検体中の牛乳タンパク質濃度を求めます。

#### 【測定操作フローチャート】

- プレート洗浄液調製
- 検体抽出液調製
- 標準品希釈液調製
- 標準品希釈 (標準溶液:0、0.78~50 ng/mL)
- 測定溶液準備
- 抗体固相化プレートを室温に戻す
- 抗体固相化プレート
  - ↓  必要数準備
- 一次反応
  - ↓  標準溶液、測定溶液 (100 μL/ウェル)
  - ↓  室温 1 時間静置
  - ↓  洗浄
- 二次反応
  - ↓  酵素標識抗体液 (100 μL/ウェル)
  - ↓  室温 30 分間静置
  - ↓  洗浄
- 酵素反応
  - ↓  発色液 (100 μL/ウェル)
  - ↓  室温 遮光 10 分間静置
- 反応停止
  - ↓  反応停止液 (100 μL/ウェル)
- 吸光度測定 (450 nm/600-650 nm)
  - ↓
- データ解析

#### 【データ解析】

1. 標準溶液を測定し、得られた吸光度から 4 係数 Logistic 解析 (4-パラメータ解析) を用いて標準曲線グラフを作成します。
2. 作成した標準曲線から、測定溶液中の牛乳タンパク質濃度 (ng/mL) を読み取ります。  
\*測定溶液の吸光度が標準曲線の吸光度より高い場合はさらに希釈して再度、測定を行ってください。

#### 【検体の調製法・抽出法】 5. 参照

3. 読み取った濃度に抽出時の希釈倍率 (基本は 400 倍) を乗じて食品中の牛乳タンパク質濃度を算出します。

#### 【使用上の注意事項】

1. 本製品内の試薬は研究目的以外に使用しないでください。
2. 保存中や反応中に強い光にさらさないでください。
3. 取扱説明書をよく読み、記載された操作方法に従って使用してください。
4. 使用期限の過ぎた製品および構成成分は使用しないでください。
5. ロットの異なる試薬や本キット以外の試薬を組み合わせ使用しないでください。
6. 測定の際は毎回標準溶液を測定し、必ず標準曲線を作成してください。
7. 試薬をこぼした場合には、手袋で手を保護し水で希釈してから拭き取ってください。
8. 試薬が皮膚、粘膜、衣類などに付着しないよう注意し、誤って目や口に入った場合には、水で十分に洗い流す等の応急処置を直ちに行い、必要があれば医師の手当てを受けてください。
9. 本製品による測定結果の評価及び利用はお客様の責任と判断において行ってください。
10. 製品の仕様については予告なく変更になる場合があります。

#### 【製品の保存条件・使用期限】

1. 冷蔵(2~8℃)の光の当たらない場所に保管してください。また、凍結は避けてください。
2. 使用期限は製品外箱ラベルに記載してあります。未開封時の使用期限です。
3. 開封した試薬はなるべく早くお使いください。

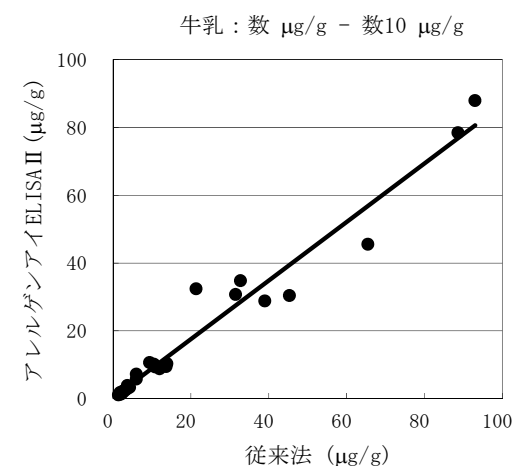
#### 【廃棄上の注意事項】

本製品、試料、測定溶液等を廃棄する場合には、当該地域の廃棄物に関する規定に従い、衛生面、環境面に十分配慮してください。

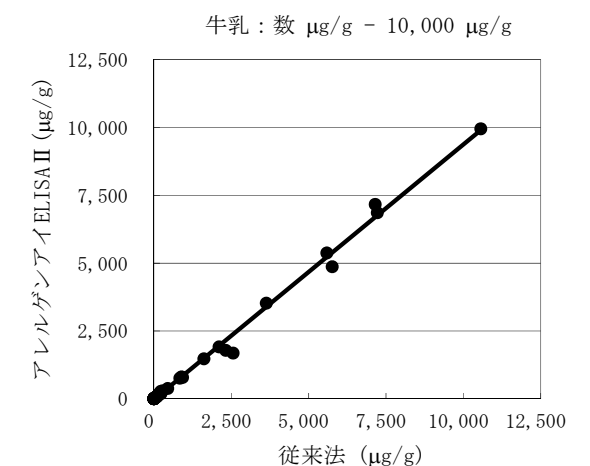
#### 【アレルゲンアイ ELISA との相関性】

複数の食品検体中の牛乳タンパク質を従来キット (アレルゲンアイ ELISA 牛乳) と本キットで定量した。従来キットによる定量値を X 軸に、本キットによる定量値を Y 軸にとり、その相関をプロットした。

その結果、傾き 0.75-1.25、相関係数 R=0.9 以上であった。



牛乳	食品数 (n)	傾き	相関係数
基準	10以上	0.75-1.25	0.9以上
結果	26	0.87	0.979



牛乳	食品数 (n)	傾き	相関係数
基準	10以上	0.75-1.25	0.9以上
結果	45	1.08	0.997

#### 【発売元】

〒300-0841 茨城県土浦市中向原 635 番地 プリマハム株式会社 基礎研究所

TEL : 029-842-4333 FAX : 029-842-5216